



①⑨ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

①⑫ **Gebrauchsmuster**
①⑩ **DE 298 17 912 U 1**

⑤① Int. Cl.⁶:
G 01 N 1/34

②① Aktenzeichen:	298 17 912.1
②② Anmeldetag:	7. 10. 98
④⑦ Eintragungstag:	21. 1. 99
④③ Bekanntmachung im Patentblatt:	4. 3. 99

⑦③ Inhaber:
Land Hessen, vertreten durch den Präsidenten der
Justus-Liebig-Universität Gießen, 35390 Gießen,
DE

⑤④ Vorrichtung zum Waschen von mikroskopierbaren Präparaten und deren Trägern, insbesondere von
Ultradünnschnitten zur Betrachtung in Transmissions-Elektronenmikroskopen, insbesondere nach
immuncytochemischer Behandlung

DE 298 17 912 U 1

DE 298 17 912 U 1

07.10.98

[Gebrauchsmusteranmeldung]



Erfinder:

Herr
Gerd Magdowski
Memeler Straße 17
35394 Giessen

Kerkraeder Straße 3
35394 Gießen

Tel.: +49 (6 41) 9 43 64-0

Fax: +49 (6 41) 9 43 64-99

e-mail: peter.stumpf@transmit.de
<http://www.transmit.de>

**Geschäftsbereich
Patent- und Innovationsberatung**

05.10. 1998

5 Anmelder nach unbeschränkter
Inanspruchnahme:

Das Land Hessen
vertreten durch den Präsidenten
der Justus-Liebig-Universität Giessen
10 Ludwigstraße 23
35390 Giessen

15

[Bezeichnung]

Vorrichtung zum Waschen von mikroskopierbaren Präparaten und
deren Trägern, insbesondere von Ultradünnschitten zur Be-
trachtung in Transmissions-Elektronenmikroskopen, insbesonde-
20 re nach immuncytochemischer Behandlung

[Beschreibung]

[Stand der Technik]

- 5 Sogenannte Ultradünnschnitte werden in der Elektronenmikroskopie regelmäßig von biologischen Zellen und Gewebestücken angefertigt, deren Struktur es meist in Transmission-Elektronenmikroskopen darzustellen gilt. Dazu müssen die typischerweise einige nm dünnen Schnitte auf Objektträgernetze
- 10 ze aufgebracht und in aufwendigen Verfahren präpariert werden. Vor dem Aufbringen der Schnitte werden die Objektträger-netze meist mit handelsüblichen Filmen (Markenbezeichnung Formvar oder Pioloform) 'befilmt', um das Einreißen der Schnitte zu verhindern.
- 15 Die verwendeten Verfahren umfassen meist 10 bis 20 einzelne Verfahrensschritte, die zu einem Drittel oder Viertel aus dem immer wieder durchzuführenden Waschen der Präparate mit ein und der gleichen Pufferlösung bestehen /1/.
- Das Waschen der Ultradünnschnitte geschieht in ebenfalls sehr
- 20 aufwendiger Weise, in dem die Objektträgernetze mit angehefteten Schnitten einzeln, auf einzelne Tropfen der Waschlösung aufzulegen sind /2/. Die Träger sind nach meistens 5 bis 10 min einzeln wieder von den einzelnen Tropfen aufzunehmen, was selbst für geschickte Arbeitskräfte einen großen Zeitaufwand
- 25 bedeutet.
- Die eigentliche Reinigung ist damit bei den konventionellen Verfahren lediglich darauf zurückzuführen, daß für das Kontrastierungsmittel im Präparat und im darunter liegenden Tropfen der Waschlösung ein Konzentrationsunterschied vor-
- 30 liegt.
- Weiterhin ist nachteilig, daß der Waschvorgang - aufgrund schwankender Benetzung des Präparates - meist nicht reproduzierbar ist, was zur mehrmaligen Wiederholung der, speziell bei Transmissions-Elektronenmikroskopen, teuren Versuchs-
- 35 durchführung führt.

[Aufgabe der Erfindung]

Der im Schutzanspruch 1 angegebenen Erfindung liegt das Problem zugrunde, eine Vorrichtung zu schaffen, die das Waschen von mikroskopierbaren Präparaten und deren Trägern
 5 zeitsparend, reproduzierbar und effektiver ermöglicht, als mit herkömmlichen Verfahren.

[Lösung der Aufgabe]

10 Dieses Problem wird mit den im Schutzanspruch 1 aufgeführten Merkmalen gelöst.

Entgegen der durch die üblichen Waschverfahren dokumentierten Lehrmeinung hat sich überraschender Weise gezeigt, daß die Verbindung zwischen mikroskopierbaren Präparaten, insbesonde-
 15 re zwischen Ultradünnschnitten und deren Trägern, insbesondere Objekträgernetze zur Transmissions-Elektronenmikroskopie, so stark ist, daß sie eine direkte frontale oder seitliche Anströmung der Präparate durch Waschlösung im Strömungsgeschwindigkeitsbereich von bis zu 20 cm/s standhält.

20

[Vorteile der Erfindung]

Mit der Erfindung wird erreicht, daß die Waschvorgänge wesentlich weniger arbeitsintensiv sind, wodurch der Präparator andere Arbeiten während der Zeit des Waschens erledigen kann.
 25 Durch Festlegung des Abstandes zwischen Präparat und der die Waschlösung zuführenden Öffnung und durch Festlegung der Öffnung der Überlaufbohrungen (5) können erstmalig reproduzierbare Waschvorgänge durchgeführt werden, was die Anzahl der, insbesondere bei Elektronenmikroskopen kostspieligen
 30 Wiederholungsaufnahmen reduziert.

Mit der vorliegenden Erfindung konnte zudem ein wesentlich größerer Wascheffekt erreicht werden, was in der Folge zu deutlich klareren Aufnahmen mit weniger 'Back-Ground', also einer geringeren Kontrastierung des Trägers führt.

[Beispiele]

Die Vorteile der Erfindung werden an den folgenden Beispielen verdeutlicht. Es zeigen:

- 5 Fig. 1 eine perspektivische Seitenansicht der Waschvorrichtung, ohne vordere Seitenwand,
- Fig. 2 eine zusammengesetzter Querschnitt durch die Waschvorrichtung in Höhe der Linien A-B, C-D, E-F der Fig. 1,
- 10 Fig. 3 einen Querschnitt durch die erfindungsgemäße Waschbox (4)

Fig. 1 zeigt eine perspektivische Seitenansicht der Waschvorrichtung, ohne vordere Seitenwand.

Zum Betrieb der Vorrichtung wird Waschlösung bei verschlossenen Ablaufventil (7) von oben über den Zugang des abnehmbaren Deckels (12) eingefüllt, bis zu einem Pegelstand, der der Höhe der aufrecht gestellten Waschbox (4) entspricht.

- 20 Um Lufteinschlüsse in der Waschbox zu verhindern, empfiehlt es sich vor dem Einsetzen die Luft aus der Waschbox (4) 'auszuschwemmen', indem mit einer Spritzflasche Waschlösung über die Öffnungen der Abdeckung (10) in die Waschbox eingeführt wird. Dazu ist auf dem Deckel eine kleine Bestückungs-
- 25 kammer (13) in der Größe der Waschbox angebracht, in die Waschlösung eingefüllt werden kann.

- Anschließend wird der Deckel (12) aufgesetzt. Je nach Stärke der Beladung der Waschbox (4) mit Präparaten und je nach gewünschtem Spüldruck wird die Waschbox (4) in eine der
- 30 Führungsschienen (5a,b,c) eingeführt, die passende Leistungsstufe der Pumpe (3) gewählt und die Überlauföffnungen (6a,b,c) geöffnet.

- Anschließend werden die Präparate in der Waschbox (4) für mindestens 30 min und längstens 90 min gewaschen, indem die
- 35 Waschlösung durch die Pumpe (3) aus der Vorratskammer (2) angesaugt und durch die Waschbox (4) in der Spülkammer (1),

sowie durch die Überlauföffnungen (6a,b,c) wieder in die Vorratskammer (2) gepumpt wird. Ein veränderlicher Anteil der Waschlösung strömt dabei je nach eingestellter Pumpstärke und Beladungsgrad der Waschbox (4) über die Oberkante der Waschbox hinweg. Ein längerer Waschvorgang als 90 min zeigt keinerlei Vorteile oder Nachteile gegenüber einer Waschkdauer von 90 min.

Eine vorteilhafte Ausgestaltung der Erfindung ergibt sich dadurch, daß zur Steuerung der Dauer und der Stärke des Waschvorgangs eine elektronisch Ansteuerung der Pumpe vorgesehen wird. Somit könnte die Pumpe zeitlich gesteuert ein- und ausgeschaltet und auch in ihrer Leistung, je nach Anforderung gesteuert werden.

Durch die letztgenannte Ausführungsart kann der Waschvorgang vollkommen unbeaufsichtigt, also z.B. über Nacht, durchgeführt werden. Die zeitliche Variation der Leistung, etwa in Form von pulsiertem An- und Abstellen der Pumpe sorgt für eine größere Verwirbelung der Waschlösung im Bereich der Präparate und damit zu einem nochmals vergrößerten Wascheffekt.

Die folgenden Ergebnisse eines Vergleiches zwischen herkömmlich gewaschenen und durch die erfindungsgemäße Waschvorrichtung gereinigten Objektträgernetzen belegen eindeutig die Vorteile der erfindungsgemäßen Waschvorrichtung.

Dazu wurden 15 Nickel-Objektträgernetze (Netze), die mit 'Formvar' (Trägerfilm) befilmt waren mit Protein-A-Gold + PBS + S auf Tropfen in einer feuchten Kammer inkubiert. (PBS = Phosphatpuffer 0.05 molar, S = Kochsalz 8.96 g/l)

Danach wurden jeweils:

(Waschlösung: Reinstwasser = Destilliertes Wasser (Bdest))

a) 5 Netze konventionell auf 6 Tropfen der Waschlösung für je 5 min gewaschen.

b) 5 Netze wurden in der erfindungsgemäßen Waschvorrichtung 30 min erfindungsgemäß gewaschen.

c) 5 Netze wurden in der erfindungsgemäßen Wascheinrichtung 60 min erfindungsgemäß gewaschen.

Anschließend wurden die Netze a) dann mit Hand auf 5 Tropfen Reinstwasser gewaschen, während die Netze b) und c) kurz mit der Spritzflasche abgespritzt wurden.

Je drei der Netzte a), b) und c) wurden auf Gleichmäßigkeit der Waschung beurteilt, was durch Betrachtung bestätigt wurde.

10 Anschließend wurden Aufnahmen bei einer Negativ-Vergrößerung von 3600-fach angefertigt. Dazu wurden die Mitte der Präparate angefahren und von den 6 in der Mitte liegenden Bildfeldern wurde die jeweils maximal mit Protein-A-Gold kontaminierte Stelle aufgenommen.

15 Die Negative der Aufnahmen wurden an einem Lichtmikroskop mit dem Objektiv 1 x über eine CCD Kamera in ein Bildanalyse-system eingescannt. Die Negative wurden dann in je 25 Bildfelder zerlegt und die Anzahl der Goldpartikel gezählt.

20 Ergebnis:

Auf je 150 Bildfelder der nach den Methoden a), b) und c) gewaschenen Netzen folgende Anzahl von Goldpartikeln:

a) (Konventionell) 1362 Au-Partikel

b) (Erfindungsgemäß, 30 min) 773 Au-Partikel

25 c) (Erfindungsgemäß, 60 min) 535 Au-Partikel

D.h. nach dem Waschen in der erfindungsgemäßen Vorrichtung ergaben sich b) 43% und in c) gar 61% weniger Gold-Verunreinigungen auf dem Film der Trägernetze (Trägerfilm

30 Formvar).

[Bezugszeichenliste]

Figuren

- (1) Spülkammer
- (2) Vorratskammer
- 5 (3) Steuerbare Pumpe
- (4) Waschbox
- (5) Führungsschienen für Waschbox
- (6) Verschließbare Überlauföffnungen
- (7) Ablaufrohr und Ventil
- 10 (8) Objekträgernetze
- (9) Trägerplatte für Objekträgernetze mit Öffnungen
- (10) Abdeckung der Waschbox mit Öffnungen
- (11) Bodenplatte der Vorrichtung
- (12) Abnehmbarer Deckel der Vorrichtung
- 15 (13) Bestückungskammer

Literatur

- 20 /1/ Elektronenmikroskopische Methodik in der Zell- und Molekularbiologie, H. Plattner, H.P. Zingsheim, Gustav Fischer, Stuttgart.
- /2/ Präparationsmethodik in der Elektronenmikroskopie, D.G. Robinson, U. Ehlers, Springer-Verlag.
- 25

07.10.98

[Anhängende Zeichnungen]

Anzahl Anhängende Zeichnungen:

Insgesamt drei Stück.

5

Fig. 1 eine perspektivische Seitenansicht der Waschvorrichtung, ohne vordere Seitenwand,

Fig. 2 eine zusammengesetzter Querschnitt durch die Waschvorrichtung in Höhe der Linien A-B, C-D, E-F der Fig. 1,

10

Fig. 3 einen Querschnitt durch die Waschbox (4)

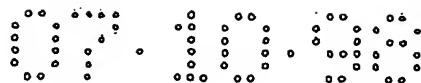
15

20

25

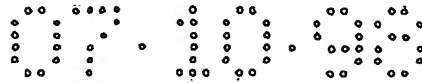
30

35



[Schutzansprüche]

1. Vorrichtung aus zähem, transparentem Material, vorzugs-
weise Plexiglas, zum Waschen von mikroskopierbaren Präpa-
5 raten und deren Trägern, insbesondere von Ultradünnschit-
ten zur Betrachtung in Transmissions-Elektronenmikros-
kopen, insbesondere nach immuncytochemischer Behandlung,
dadurch gekennzeichnet, daß mehrere Präparate und Träger
in einem Waschvorgang von einer Waschlösung über- bzw.
10 teilweise durchströmt werden.
2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß
die Strömungsgeschwindigkeit durch eine steuerbare Pumpe
(3) einstellbar ist.
15
3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeich-
net, daß die Strömungsgeschwindigkeit durch Variation des
Abstands zwischen der Waschbox (4) und der die Lösung zu-
führenden Öffnung einstellbar ist.
20
4. Vorrichtung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis
3, dadurch gekennzeichnet, daß die Waschlösung umlaufend
von der Spülkammer (1) in die Vorratskammer (2) und wie-
der in die Spülkammer gepumpt wird.
25
5. Vorrichtung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis
4, dadurch gekennzeichnet, daß die Vorrichtung durch ein
kistenförmiges Gehäuse aus transparentem, zähem Material,
vorzugsweise Plexiglas umfaßt wird, wobei das Gehäuse
30 rechtwinklig aus vier Seitenwänden, einer Bodenplatte
(11) und einem abnehmbarem Deckel (12) mit Bestückungs-
kammer (13) aufgebaut ist.
6. Vorrichtung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis
35 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Waschvorgang zeitlich



über eine elektrische Ansteuerung der Pumpe steuerbar ist.

- 5 7. Vorrichtung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Waschlösung über ein Ablaufrohr mit Ventil (7) abgelassen werden kann.
- 10 8. Waschbox (4) nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß in die zur Aufnahme der Präparate dienende ausgebildeten Kavitäten der Trägerplatte (9) Bohrungen eingelassen sind.
- 15 9. Waschbox (4) nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Abdeckung (10) aufweist, die vom Präparat aus gesehen stromaufwärts angebracht ist und durch Bohrungen strömungsführend wirkt.
- 20 10. Waschbox nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß pro Präparat tragender Kavität genau eine Bohrung in der Abdeckung (10) vorgesehen ist, die konzentrisch und stromaufwärts zur Bohrung in der Präparat tragenden Kavität angebracht ist.

07.10.98

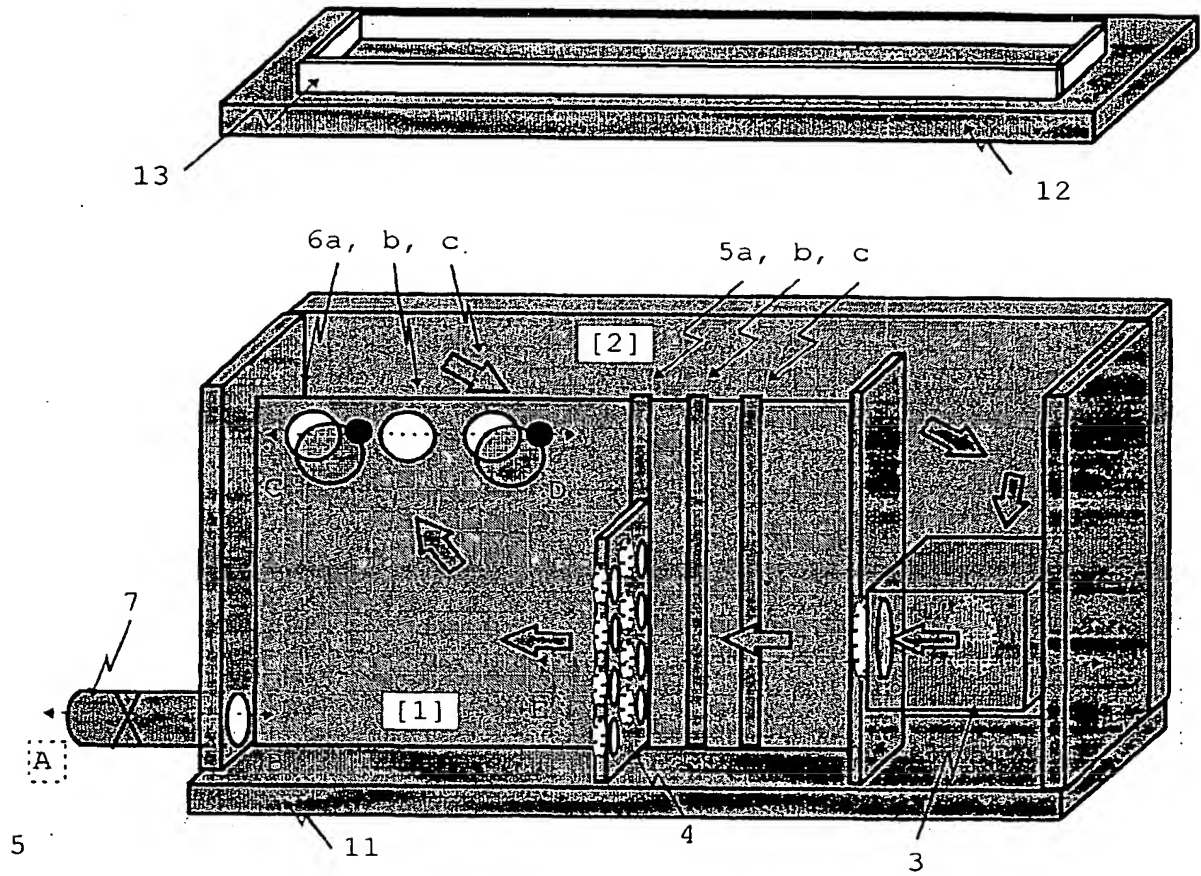
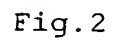


Fig. 1

25



07.10.98

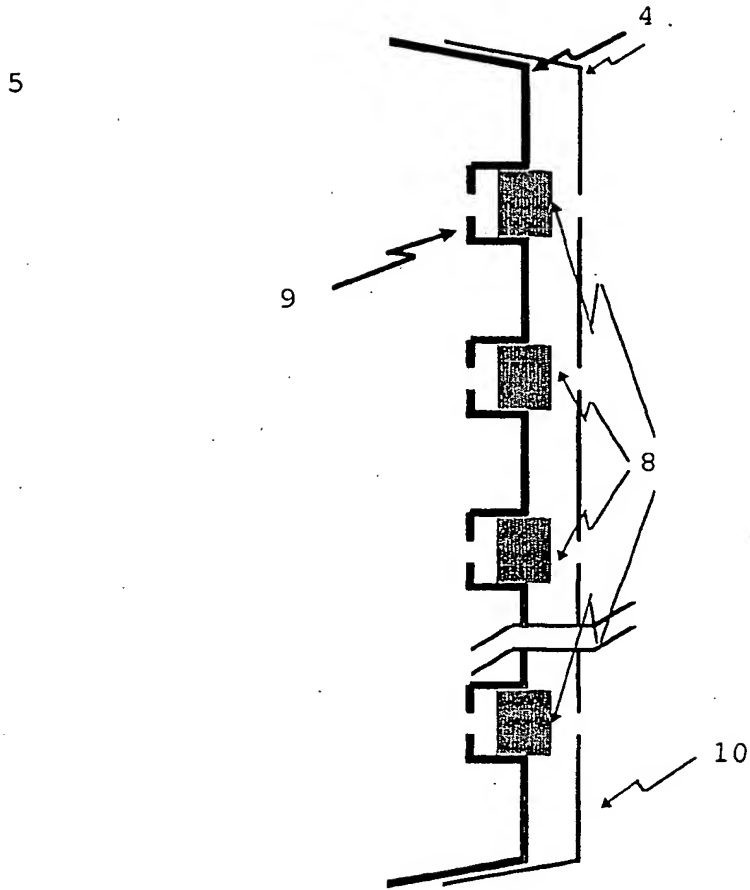


Fig. 3